RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
Vol. XXXIV. Fasc. I.-II.

Gabinetti scientifici dell' Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia
diretti dal Dott. Carlo Ceni

Dott. GIACOMO PIGHINI

Sul potere che hanno la colesterina e la sostanza nervosa di neutralizzare la emolisi da lecitina e da sieri specifici

REGGIO-EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1908.

RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
VOL. XXXIV. FASC. I.-II.

Gabinetti scientifici dell' Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia
diretti dal Dott. CARLO CENI

Dott. GIACOMO PIGHINI

Sul potere che hanno la colesterina e la sostanza nervosa di neutralizzare la emolisi da lecitina e da sieri specifici

REGGIO-EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1908.

Gabinetti scientifici dell' Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia
diretti dal Dott. CARLO CENI

[616. 07-6]

La elettività di azione che spiega la tossina tetanica sul sistema nervoso centrale e la facilità di ottenere l' antitossina dagli animali immunizzati, avevano mosso il Wassermann a pensare che la tetanotossina trovasse nella sostanza nervosa quelle condizioni necessarie - secondo le vedute di Ehrlich - alla moltiplicazione dei ricettori immunizzanti, e alla loro caduta nel circolo. Nel sistema nervoso centrale adunque avrebbe dovuto esistere una sostanza capace di legare la tossina e di neutralizzarla; e a dimostrarlo il Wassermann, in collaborazione con Takaki [1], faceva le classiche esperienze mettendo a reagire *in vitro* tossina tetanica e tessuto nervoso emulsionato in soluzione fisiologica. Inoculata, dopo un certo tempo, la miscela sottocute a dei topi albini, si dimostrava innocua; mentre i controlli, inoculati con corrispondenti dosi di sola tossina, morivano. Non solo: la inoculazione di emulsioni cerebrali fatta 24 ore prima della iniezione tossica avevano un eguale potere difensivo. Si dimostrava con ciò - e ricerche posteriori di Blumental, Ransom, Asakawa, Marx ecc. lo confermano - che la sostanza del cervello o del midollo spinale esercita un potere neutralizzante sulla tossina tetanica.

Stabilito il fatto, questo venne poi variamente interpretato ed invocato a sostegno ora di questa, ora di quella teoria. Chi forse vide più giusto nella questione fu il Metchnikoff il quale, più che a speciali catene laterali del protoplasma nervoso, attribuì a certe sostanze grasse in esso contenute la proprietà di fissare il veleno e di neutralizzarlo; e tra queste sostanze egli indicava la lecitina, la colesterina, la tirosina.

Seguendo quella via l' Almagià [2] sperimentò l' azione della lecitina e della colesterina negli animali iniettati di

1 Wassermann e Takaki. Ueber tetanus-antitoxische Eigenschaften des normalen Centralnervensystens. *Berl. Klin. Wochensch.* N. 1, p. 5 1898.
2 Almagià. Sul rapporto fra sostanza nervosa centrale e tossina del tetano. R. Accad. med. di Roma. Seduta del 27 Genn. 907.

tossina tetanica; e infatti trovò che, specialmente colla colesterina, si riesce a salvare cavie già intossicate, e votate alla morte come i controlli *.

Alla colesterina inoltre venne riconosciuta un' altra azione, che potremmo chiamare antiemolitica, in quanto, - in determinate circostanze - può impedire l' emolisi prodotta da certe sostanze tossiche. Fu il Ransom [1] che la mise in evidenza, studiando il fenomeno della emolisi della saponina; riesciva il Ransom a dimostrare che la saponina emolizzava i globuli rossi per la sua tendenza a reagire e a legarsi colla colesterina in essi contenuta. Trattando previamente i globuli con emulsioni di colesterina infatti, la saponina veniva neutralizzata, e non si osservava più emolisi. Una analoga azione protettiva venne in seguito dimostrata dal Morgenroth [2] pei tossolecitidi del veleno delle api, e lo stesso ricercatore esprime l' ipotesi che la azione protettiva dei sieri normali, già riscontrata dal Langer, di fronte a certe tossine sia dovuta al loro contenuto di colesterina.

Ad illustrazione di questi ancora tanto oscuri fenomeni di neutralizzazione dei tossici e delle emolisine mi sono proposto di studiare la azione della colesterina e della sostanza nervosa emulsionata in rapporto alla lecitina e a sieri emolitici specifici.

Emolisi da lecitina.

La lecitina — come ha tra gli altri dimostrato recentemente la Lévy [3] — esercita un' azione emolitica sulle emazie. Questa azione si esplica in dose minima di sostanza avendola io potuta

* Questi risultamenti indussero l'Almagià, in collaborazione col Mendes **, a sperimentare l'azione della colesterina nel tetano umano. Due casi di tetano dichiarato vennero trattati con iniezioni di colesterina in dosi progressive a g. 1.5 *p.d;* e l' effetto fu veramente lusinghiero, essendosi ottenuta la guarigione: occorrono però altre e numerose riconferme prima di poter ritenere la colesterina come l' antidoto chimico della tetanotossina. Seguendo analoghi concetti, nella ipotesi che la reazione elettiva del sistema nervoso centrale al tossico epilettogeno provocasse anche una neutralizzazione dello stesso, volli sperimentare se alla colesterina spettasse una tale supposta azione neutralizzante. Sottoposi dieci epilettici gravi a ripetute iniezioni giornaliere di colesterina disciolta in olio di oliva ed etere *aa*; ho potuto invero notare qualche miglioramento nei primi giorni della cura, ma in breve la malattia riprendeva il suo dominio, sicchè l' esito complessivo delle mie ricerche è risultato negativo.

** Almagià. Il trattamento delle iniezioni di colesterina nel tetano. R. Accad. Med. di Roma. Seduta del 27 Gennaio 1907.

1 F. Ransom. Saponin und sein Gegengift. *Deutsche mediz. Wochenschr.* N. 13, p. 194, 1901.

2 I. Morgenroth e U. Carpi. Uber ein toxolecithid des Bienengiftes. *Ber. Klin. Wochenschr.* p. 1424, 1906.

3 M.lle Levy. Hémolyse des globules rouges par la lecithine. *Soc. di Biol.* p. 692. 1906.

già osservare a g 0,0002 in 1 cmc di emazie al 5 $^0/_0$. Ricorderò ancora che in questi ultimi anni venne scoperta nella lecitina la strana proprietà di rendere fortemente attivi, anche in dose infinitesimale, i secreti velenosi di molti serpenti e delle api, formando con essi dei composti — detti tossolecitidi — estraibili col metodo di Kyes, il loro primo illustratore. L' azione emolitica del tossolecitide del veleno delle api viene completamente neutralizzata, come si è visto sopra, dalla colesterina. È assai probabile che, in tali casi, la colesterina agisca direttamente sulla lecitina, e spieghi in tal modo la sua azione protettiva verso le emazie. Le esperienze che riporto illustrano infatti la azione neutralizzante della colesterina verso il potere emolitico della lecitina.

Ho usato lecitina direttamente preparata dal giallo d' ovo, e lecitina Merck, ottenendo identici resultati. Dalla soluzione al 5 $^0/_0$ in alcool metilico preparavo una emulsione in acqua fisiologica all' 1 $^0/_0$, per cui in ogni cmc era contenuto g 0,0005 di lecitina. Della colesterina (Merck) preparavo una emulsione all' 1 $^0/_0$ in liquido fisiologico.

Per la emolisi mi sono sempre servito di sangue di bue defibrinato; dalle emazie centrifugate e lavate varie volte con soluzione fisiologica (0,85 $^0/_0$), veniva preparata una sospensione al 5 $^0/_0$, e di questa usato 1 cmc per ogni esperienza.

Il livello eguale in ciascun tubo veniva raggiunto aggiungendo il solito liquido fisiologico al 0,85 $^0/_0$. Preparata la serie dei tubetti, si teneva in termostato a 37° per due ore, indi in ghiacciaia sino al giorno seguente, in cui si faceva la lettura definitiva.

Da varie serie di esperienze, riporto nella seguente tabella una delle più comprensive.

	Lecitina g	Colesterina g	EMOLISI dopo 2 ore a 37°	EMOLISI dopo 24 ore
1	0,0002	—	—	completa
2	0,0005	—	completa	completa
3	0,0005	0,005	0	quasi completa
4	0,0005	0,01	0	0
5	0,001	0,01	0	leggiera
6	0,001	0,015	0	0

Risulta da essa come la colesterina neutralizzi completamente la azione emolitica della lecitina, ed in dosi propozionali alla quantità di quest' ultima. Crescendo infatti la quantità di lecitina, occorre una quantità relativamente maggiore di colesterina per impedire la emolisi.

Un completo parallelismo a questi fatti si riscontra nelle reazioni fra lecitina, sostanza nervosa emulsionata e globuli rossi. Ho voluto infatti sperimentare se anche la sostanza nervosa, triturata e spappolata passata per un fine setaccio ed emulsionata in soluzione fisiologica, esercitasse azione protettiva sulle emazie di fronte alla lecitina. La esperienza è riuscita positiva. Circa 5 g di sostanza nervosa cerebrale - o midollare (non ho riscontrato notevoli differenze fra le due) - trattata come si è detto, venivano emulsionati in circa 30 cmc di soluto fisiologico.

La tabella seguente illustra una fra le tante prove fatte:

	Lecitina g	Emulsione di sost. nervosa g	EMOLISI dopo 2 ore a 37°	EMOLISI dopo 24 ore
1	0,0005	—	completa	completa
2	0,0005	0,5	0	0
3	0,001	0,5	leggiera	leggiera
4	0,001	1	0	0
5	0,002	1	0	leggiera
6	0,002	1,5	0	0

La sostanza nervosa emulsionata, adunque, opera in modo analogo alla colesterina, neutralizzando la azione emolitica della lecitina; e questo suo potere è proporzionale alla sua quantità.

Emolisi da siero specifico.

Ho preparato uno siero di coniglio emolitico per globuli rossi di bue, ed ho sperimentato su quello il potere neutralizzante della colesterina e della sostanza nervosa. Sempre sulla stessa quantità di emazie di bue, facevo agire dosi varianti di siero termostato e di complemento (siero fresco di cavia),

aggiungendo quantità varianti di colesterina nella solita emulsione all' 1%.

	Ambocettore cmc	Complem. cmc	Colesterina g	EMOLISI dopo 2 ore a 37°	dopo 24 ore
1	0,01	0,1	—	completa	completa
2	0,01	0,1	0,001	leggiera	leggiera
3	0,01	0,1	0,005	0	0
4	0,05	0,1	0,005	0	0
5	0,05	0,5	0,005	0	0
6	0,1	0,5	0,005	leggiera	completa
7	0,1	0,5	0,01	0	0

Risulta che la colesterina esercita una azione neutralizzante sul siero specifico, azione che è proporzionale alla sua quantità.

Una analoga azione viene esercitata dalla sostanza nervosa. Servendomi infatti di emulsioni di cervello o di midollo preparate nel modo descritto, ho potuto dimostrare che la emolisi, in presenza di dette sostanze, non aveva più luogo.

Lo illustra la seguente tabella:

	Ambocettore cmc	Complem. cmc	Sostanza nervosa cmc	EMOLISI dopo 2 ore a 37	dopo 25 ore
1	0,01	0,1	—	completa	completa
2	0,01	0,1	0,2	leggiera	leggiera
3	0,01	0,1	0,5	0	0
4	0,05	0,1	0,5	0	0
5	0,05	0,5	0,5	leggiera	leggiera
6	0,05	0,5	1	0	0
7	0,1	0,5	1	0	0

Anche la sostanza nervosa emulsionata, adunque, neutralizza il potere emolitico del siero specifico, agendo in ragione della sua quantità.

Nelle quattro serie di ricerche viene dimostrato che la colesterina e la sostanza nervosa del cervello o del midollo spinale (di bue e cane) esercitano sulla emolisi prodotta da lecitina o da sieri specifici un' azione neutralizzante. Questa azione pare sia proporzionale alla quantità di sostanza messa a reagire, poichè si è visto che per dosi crescenti di lecitina o di siero occorrono dosi crescenti rispettivamente di colesterina e di emulsione nervosa per impedire la emolisi.

Sorge ora il quesito se il parallelismo fra le due azioni neutralizzanti sia dovuto a sostanze diverse dotate di identiche proprietà, o piuttosto a identiche sostanze e nel qual caso alla colesterina che eventualmente possa trovarsi libera nella emulsione della massa nervosa.

Nel sistema nervoso centrale, infatti, è noto come una parte della colesterina si trovi allo stato libero, vale a dire non combinata coi proteici e coi lipoidi (Baumstark). È quindi possibile che nella emulsione acquosa di sostanza nervosa questa colesterina libera agisca nello stesso modo che nella emulsione di colesterina pura. In questo modo si spiegherebbe facilmente come le due sostanze sperimentate — sostanza nervosa e colesterina — abbiano uno stesso effetto neutralizzante sulle emolisine.

Circa al modo di azione, ben poco può aggiungersi di positivo. Studi recenti — quali quelli di Neuberg, Reicher, Rosenberg [1] — tenderebbero ad includere molti processi emolitici (ed anche batteriolitici) in quelli lipolitici, e ad attribuire alle sostanze lipoidi dei corpuscoli rossi la parte essenziale nella produzione delle emolisine specifiche (Gottlieb e Lefmann [2]). Se tali ricerche verranno confermate, si potrà forse trovare un rapporto fra azione lipolitica e azione antagonistica della colesterina, già conoscendosi le affinità che ha l' alcool complesso

[1] C. Neuberg u. E. Rosenberg. Lipolyse, Agglutination und Hämolyse - I - *Berl. Klin. Wochenschr.* N. 2, 1907
C. Neuberg u. C. Reicher. - id. II - *Biochem. Zeitschr.* IV, 1907.
id. id. - id. III - *Münch. mediz. Wochenschr.* N. 35, 1907.

[2] *Medizin. Klinik.* N. 15, 1907.

colesterina con le sostanze lipoidi, e i reciproci rapporti di questi colle lipasi. Ma siamo tuttora nel campo delle ipotesi.

Le mie ricerche, indirettamente, si riallacciano ad altre che, di recente, hanno suscitato certo rumore nella patologia. Alludo alla applicazione della reazione Wassermann alla ricerca di antigeni ed anticorpi sifilitici nel liquido cefalorachidiano dei paralitici e dei tabetici, allo scopo di stabilire la origine specifica di queste malattie. Come è noto il metodo di Wassermann e Bruck già applicato con successo nella determinazione di anticorpi specifici in molte malattie infettive (mal rosso dei suini, tifo, ecc.) nel caso speciale della ricerca di anticorpi sifilitici nel liquido cefalorachidiano consiste in ciò: che la emolisi prodotta da un siero emolitico termostato e dal complemento non avviene più quando nello stesso tubo si mettano a reagire un estratto di organi sifilitici e una certa quantità di liquido rachidiano contenente gli anticorpi ricercati. Il fenomeno viene interpretato come una deviazione del complemento; vale a dire che il complemento, invece di effettuare la emolisi preparata dall'ambocettore specifico, va a favorire la reazione fra le tossine sifilitiche e le supposte antitossine. In seguito alle ripetute prove positive (Wassermann, Plaut, Schütze ecc.) ottenute con liquido cefalorachidiano di casi di paralisi progressiva e di tabe dorsale, si volle ritenere come dimostrata la natura sifilitica di tali malattie. Questa conclusione però pecca di ardimento, se non altro per essere dedotta dalla interpretazione di fenomeni che ancora ci sono sconosciuti nella loro intima essenza. Più che opportune infatti giungono le recenti ricerche condotte da Levaditi e Jamanouchi a smorzare i facili entusiasmi, e a gettare qualche lume sulla genesi della strana reazione. I due studiosi cominciarono anzitutto a constatare che l' estratto di fegato sifilitico non è un antigeno nel vero senso della parola, essendo il suo principio attivo contenuto nell' estratto alcoolico dell' organo, e composto di una miscela di lipoidi e di acidi biliari. Trovarono inoltre che anche il principio attivo contenuto nel siero dei sifilitici e nel liquido cefalorachidiano dei paralitici è parimenti estraibile in alcool, e consta di lipoidi e di sali. Questo estratto alcoolico (sospeso, s' intende, in soluzione fisiologica) in presenza di estratto acquoso o alcoolico di fegato, impedisce l' emolisi; e la impedisce egualmente anche in assenza di estratto di fegato, purchè venga adoperato in dose più forte.

Vi è di più: che se si paragona la forza anticomplementare degli estratti di sieri o liquidi patologici con estratti testimoni (di persone normali) si constatano solo delle piccole differenze quantitative. Non è più il caso, quindi, di parlare — conchiudono razionalmente i due ricercatori — di deviazioni di complemento provocate dalla reazione di veri antigeni ed anticorpi; ma di sostanze solubili nell' alcool e nell' etere che si troverebbero in maggiore quantità nei tessuti e liquidi patologici in questione, e che sarebbero dotate di una netta azione anticomplementare [1].

Ora, analogamente a tali estratti, agiscono la colesterina e la emulsione di sostanza nervosa. Come si è sopra dimostrato, di fronte al siero emolitico esse spiegano un potere nettamente anticomplementare. È il caso quindi di chiedersi se gli estratti alcoolici ottenuti da Levaditi e Jamanouchi non contenessero della colesterina, la quale, — come è noto — si trova libera nella bile e nella sostanza nervosa. Un estratto alcoolico di fegato, infatti, può contenere colesterina; e se la colesterina non è compresa fra i componenti normali del liquido cefalo-rachidiano, potrebbe diffondervisi dalla sostanza nervosa circostante in condizioni patologiche. Ricorderò, per giustificare questa supposizione, che Mott e Halliburton, Donath, Gumprecht ed altri hanno rivelato nel liquido cefalorachidiano di gravi malattie distruttive del sistema nervoso centrale (e specie nella paralisi progressiva) la colina, vale a dire una base che è il prodotto di scomposizione della lecitina.

Se adunque lo sfacelo della sostaza nervosa permette il passaggio della colina nel liquido rachidiano, nulla osta al supporre che anche la colesterina possa seguire, in condizioni abnormi, quella via. Risponderanno a queste supposizioni le ricerche in proposito che ora stiamo conducendo; alle quali anche ci invita un fatto recentemente dimostrato da Breton, Massol e Petit: avere il liquido cefalo-rachidiano di certi alienati paralitici, epilettici, dementi ecc. il potere di impedire la emolisi provocata dalla lecitina [2].

---

[1] Levaditi et T. Jamanouchi. Séro-reaction de la syphilis et de la paralysie generale. *Soc. de Biol.* Séance da 11 Ianv. 1908.

[2] Breton, Massol et Petit. Influence du liquide céfalo-rachidien sur le pouvoir hémolytique du venin de Cobra en présence de lécithine. *Soc. de Biol.* Séance du 8 févr. 1908.